



KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030009464 A

(43)Date of publication of application: 29.01.2003

(21)Application number: 1020027014691
 (22)Date of filing: 01.11.2002
 (30)Priority: 04.05.2000 DE2000
 10021731

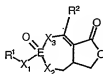
(71)Applicant: SANOFI-AVENTIS
 DEUTSCHLAND GMBH
 (72)Inventor: VERTESY LASZLO
 EHRLICH KLAUS
 KURZ MICHAEL
 WINK JOACHIM

(51)Int. Cl. C07F 9/6574

(54) CYCLIPOSTINS, A METHOD FOR THEIR PRODUCTION AND THE USE OF THE SAME

(57) Abstract:

The invention relates to compounds of the general formula (I), wherein R¹, R², E, X¹, X² and X³ have the definitions in this application, obtained by the cultivation of the *Streptomyces* species HAG 004107 (DSM 13381) and to the physiologically compatible salts and chemical equivalents of said compounds. The invention also relates to a method for producing the cyclipostins and their physiologically compatible salts and chemical equivalents as medicaments, in particular as inhibitors of lipases, and to pharmaceutical preparations containing cyclipostin or a physiologically compatible salt or equivalent thereof.



copyright KIPO & WIPO 2007

Legal Status

Date of request for an examination (20060322)

Notification date of refusal decision ()

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20070830)

Patent registration number (1007798670000)

Date of registration (20071121)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent ()

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

Date of extinction of right ()

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보 (A)

(51) 。 Int. Cl. 7
C07F 9/6574

(11) 공개번호 특2003 -0009464
(43) 공개일자 2003년01월29일

(21) 출원번호 10 -2002 -7014691
(22) 출원일자 2002년11월01일
번역문 제출일자 2002년11월01일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2001/04652
(86) 국제출원출원일자 2001년04월25일

(87) 국제공개번호 WO 2001/83497
(87) 국제공개일자 2001년11월08일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 - 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구아바루다, 코스타리카, 도미니카연방, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 쿨롬비아, 그레나다, 가나, 감비아, 인도네시아, 인도, 유고슬라비아, 짐바브웨, 크로아티아, 시에라리온, AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아, EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키, OA OAPI특허: 부르키나파소, 베냉, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비소,

(30) 우선권주장 10021731.1 2000년05월04일 독일 (DE)

(71) 출원인 아텔리스 파마 도이칠란트 게엠베하
독일 데 -65929 프랑크푸르트 브뤼닝슈트라세 50

(72) 발명자 베르테시라스클로
독일65817엠피타인 -폭켄하우젠엠피타이너백6
에를리히클라우스
독일65428웨셀사임뒤켈도르페슈트라세11
쿠르츠미하엘
독일65719호프하임예를렌백7
빙크요아힘
독일63322외데르마르크마그테부르거슈트라세14

(74) 대리인 이병호

심사청구 : 없음

(54) 사이클리포스틴, 이의 제조 방법 및 용도

요약

본 발명은 스트렙토마이세스 종 HAG 004107(DSM 13381)의 배양에 의해 수득되는 화학식 I의 화합물 및 이의 생리학적 용도로 허용되는 염 및 화학적 등가물에 관한 것이다.

화학식 I



상기식에서, R¹, R², E, X₁, X₂ 및 X₃은 본원에서의 정의를 갖는다.

본 발명은 또한, 약제로서, 특히 리파제 억제제로서의 사이클리포스틴 및 이의 생리학적으로 허용되는 염 및 화학적 등가물을 제조하는 방법 및 사이클리포스틴 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염 또는 등가물을 함유하는 약제학적 제제에 관한 것이다.

색인어

스트렙토마이세스 종 HAG 004107, 사이클리포스틴, 리파제 억제제, 호르몬 감수성 리파제, 항당뇨병제, 진성 당뇨병

명세서

본 발명은 스트렙토마이세스 종 HAG 004107(DSM 13381)을 배양하여 수득할 수 있는 사이클리포스틴으로 불리는 신규한 화합물, 및 이의 생리학적으로 허용되는 염 및 화학적 등가물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 사이클리포스틴의 제조 방법, 미생물 HAG 004107(DSM 13381), 사이클리포스틴 및 이의 생리학적으로 허용되는 염 및 화학적 등가물의 약제로서의 용도, 특히 리파제 억제제로서의 용도, 및 사이클리포스틴 또는 생리학적으로 허용되는 염 또는 이의 등가물을 함유하는 약제에 관한 것이다.

리파제 억제제를 사용하여 특히 유리하게 치료할 수 있는 질환은 당질환인 진성 당뇨병(diabetes mellitus)이다. 진성 당뇨병은 만성 대사성 질환으로 인한 혈당 농도의 증가로 특성화되는 상태이다. 대사성 질환은 인슐린 결핍 또는 인슐린 작용 감소에 기인한다. 인슐린 작용의 결핍은 혈중 흡수된 당에 대한 체세포에 의한 이용 부족을 초래한다. 이로 인해 탄수화물로부터 당의 신합성(gluconeogenesis)으로 인해, 혈당 수치가 높아진다. 또한, 지방 조직에서의 인슐린 작용 감소의 경우, 글루카곤 같은 인슐린-길항 호르몬이 지방분해 증가를 초래하여 결과적으로 혈중 지방산 농도를 증가시킨다. 케토산혈증(ketoacidosis)이 일어나며, 즉 케톤체(아세트산, β-하이드록시부티르산, 아세톤)의 형성 증가가 일어난다. 급성 상태하에서, 생화학적 조절 이상의 정도는 치명적이며 치료하지 않는 경우 당뇨병 혼수상태를 초래

하여 결국 급사를 초래한다. 당뇨병은 사람의 가장 흔한 만성 대사성 질환에 속하며 인구의 3% 이상이 당뇨병 또는 전 당뇨병 특성을 가지며 따라서 매우 위협적인 것으로 평가되고 있다. 따라서, 진성 당뇨병의 치료제 또는 치유제가 매우 필요하다.

당뇨병은 인슐린 투여로 치료되며 비인슐린 -의존성 (NIDDM) 또는 제II형 당뇨병으로 불리는 성인성 당뇨병에서는, 설폰닐우레아가 우선적으로 투여된다. 설폰닐우레아의 작용 원리는 췌장에서 β -세포의 인슐린 분비를 촉진시켜 인슐린 결핍 또는 인슐린 내성을 보충하는 것이다. 그러나, 상태가 진행되면, 인슐린이 또한 사용되어야만 한다. 인슐린의 작용은 하기 방식으로 요약될 수 있다. 이러한 펩타이드성 호르몬은 혈당 농도를 떨어뜨리 동화작용의 증가를 초래하고 동시에 이화작용을 억제시킨다:

- 인슐린은 체세포에서 글루코오스 수송을 증가시키고,
- 인슐린은 간 및 근육에서 글리코겐 형성을 증가시키고,
- 인슐린은 지방분해를 억제하고,
- 인슐린은 지방산의 지방 조직내로의 흡수를 증가시키며,
- 인슐린은 아미노산의 체세포내로의 흡수를 증가시키고 단백질 합성을 증가시킨다.

인슐린의 가장 강력한 효과 중 하나는 지방분해의 억제이다. 제II형 당뇨병의 경우, 지방분해에 대한 이러한 조절은 더 이상 효과적이지 못하며 혈중 유리 지방산 수치의 증가가 초래된다. 혈중 유리 지방산은 간에서 당 신합성 (gluconeogenesis)을 자극하고 골격근에서 글루코오스의 사용을 감소시킨다. 지방 세포에서 발견되며 인산화 중독과정에 의해 인슐린에 의해 억제되는 소위 호르몬 -감수성 리파제 (HSL)에 의한 지방산의 방출인 지방분해가 조절된다. 따라서, HSL의 억제적인 억제제는 인슐린 작용을 촉진시키는 데 바람직하며 혈중 지질 수치를 감소시킬 수 있다. 상기 제제는 지질 대사를 조절하여 제II형 당뇨병을 치료하는데 적합하지만, 다른 저장성 질환에 대한 적용도 또한 가능할 것이다. 이러한 이유로 인해, HSL 및 다른 리파제의 신규한 억제제가 긴급히 필요하며 따라서 연구되고 있다.

본원에 이르러, 발람게도, 미생물 균주 스트렙토마이세스 중 HAG 0041107 (DSM 13381)이 매우 낮은 농도에서 조상기 호르몬 -감수성 리파제를 억제하는 매우 활성인 신규한 리파제 억제제를 형성할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 상기 신규한 천연 화합물은 이중 환계 (바이사이클) 및 치환된 탄소쇄로 이루어지고 리파제를 특이적으로 억제하는 유기포스페이트이다. 탄소쇄 대신에 메틸 그룹만을 갖는 환 구조는 처음에 문헌 [R. Neumann & H.H. Peter in *Experientia*, Volume 43, pages 1235 -1237, 1987]에서 아세틸콜린 에스테라제 억제제 CGA 134 736으로서 기술되었으며 이후 문헌 [T. Kurokawa et al., *J. Antibiotics*, 46, 1315 -1318, 1993]에서 동일한 화합물이 사이클로포스핀으로 명명되었다. 상기 구조적으로 연관된 화합물은 선택적인 리파제 -억제 특성을 전혀 갖지 않는다. 이전에 공지된 물질들은 만족스럽지 않은 작용 수준, 높은 독성 및/또는 바람직하지 않은 부작용이 나타나는 단점을 갖는다.

따라서, 본 발명은 모든 입체화학 형태 및 모든 비율의 이러한 형태의 혼합물로서 화학식 I의 화합물, 및 이의 생리학적 으로 허용되는 염 및 화학적 등가물에 관한 것이다.

화학식 I



상기식에서,

R¹은 (1) 직쇄 또는 측쇄, 포화 또는 불포화된, 카보 - 또는 헤테로사이클릭일 수 있고, 치환되지 않거나 (1.1) -OH, (1.2) =O, (1.3) -O -C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.4) -O -C₂-C₆-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.5) -C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.6) -아릴, (1.7) -C₁-C₆-알킬벤젠, (1.8) 디페닐, (1.9) -NH -C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.10) -NH -C₂-C₆-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.11) -NH₂, (1.12) =S, (1.13) -S -C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.14) -S -C₂-C₆-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 측쇄이다) 또는 (1.15) 할로젠(이때, 치환체 1.1 내지 1.15는 또한 부가적으로 치환될 수 있다)에 의해 일 - 또는 이치환된, 탄소수 2 내지 30의 탄소쇄; 또는 (2) [-아릴 -(CH₂)_n]_m이 치환되지 않거나 치환체 1.1 내지 1.15로 일 - 또는 이치환된 -[-아릴 -(CH₂)_n]_m이때, n 및 m은 서로 독립적으로 0, 1, 2 또는 3이다)이고;

R²는 (1) C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 치환되지 않거나 치환체 1.1 내지 1.15로 일 - 또는 이치환된다), (2) C₂-C₆-알케닐(이때, 알케닐은 치환되지 않거나 치환체 1.1 내지 1.15로 일 - 또는 이치환된다), 또는 (3) C₂-C₆-알키닐(이때, 알키닐은 치환되지 않거나 1.1 내지 1.15로 일 - 또는 이치환된다)이고;

E는 인(P) 또는 황(S) 원자이며,

X₁, X₂ 및 X₃은 서로 독립적으로 (1) -O -, (2) -NH -, (3) -N=, (4) -S - 또는 (5) -CH₂ - 및 -CHR²이다.

R¹은 바람직하게는, 탄소수 6 내지 24, 매우 바람직하게는 탄소수 10 내지 18의 세 길이를 갖는다. 세는 포화된, 예를 들면, -알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), 또는 불포화된, 예를 들면, -알케닐 또는 -알키닐(이때, 알케닐 또는 알키닐은 직쇄 또는 측쇄이다)일 수 있다. R¹은 비치환되거나 상기 기술된 바와 같은 그룹 1.1 내지 1.15에 의해 동일하거나 상이하게 일 - 또는 이치환될 수 있다. 탄소 원자 8' 내지 16' 상에서 상기 치환체가 바람직하며 위치 10' 내지 14'가 특히 바람직하다. 치환체 1.1 내지 1.15는 또한 부가적으로 알콜, 알데하이드, 아세탈, 케탈, 에테르, 카복실, 에스테르, 아미노, 니트릴, 니트로, 옥실, 옥실 에테르 및 할로겐으로부터 선택된 하나 이상의 그룹으로 치환될 수 있다.

탄소수 2 내지 30의 카보사이클릭 탄소쇄는 바람직하게는 각각의 경우 탄소수 4, 5, 6 또는 7로 이루어지는 하나 이상의, 바람직하게는 하나, 둘 또는 세 개의 환계를 갖는 탄소수 2 내지 30으로 이루어진 쇠이다. 환은 모노 -, 디 - 또는 트리사이클릭, 바람직하게는 모노사이클릭일 수 있으며, 탄소쇄의 개시부, 중심 및/또는 말단에 위치할 수 있다. 카보사이클은 지방족 또는 방향족 특성일 수 있다. 예로는 치환된 디페닐 또는 알킬벤젠이 있다.

탄소수 2 내지 30의 헤테로사이클릭 탄소쇄는 하나 이상의 탄소 원자가 O, S 또는 N 같은 헤테로원자로 교체되는 하나 이상의, 바람직하게는 하나 내지 세 개의 환계를 갖는 탄소수 2 내지 30으로 이루어진 쇠이다. 이러한 환은 모노 -, 디 - 또는 트리사이클릭, 바람직하게는 모노사이클릭일 수 있으며, 탄소쇄의 개시부, 중심 및/또는 말단에 위치할 수 있다. 이들은 바람직하게는 4 -, 5 -, 6 - 또는 7 -원 환일 수 있으며, 이는 지방족 또는 방향족 특성일 수 있다. 예로는 치환되거나 치환되지 않은 알킬 피페리딘이 있다.

아릴은 치환되지 않거나 치환된 알킬페놀 또는 알킬나프톨 같은 탄소수 6 내지 14, 바람직하게는 6 내지 10의 방향족 환 또는 환계이다. 할로젠은 클로라이드, 브로마이드, 플루오라이드 또는 슈도할라이드(예를 들면, 시아나이드(니트릴))이다.

-C₁ -C₆ -알킬은 탄소수 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인 직쇄 또는 측쇄 알킬, 예를 들면, 메틸, 에틸, i -프로필, 3급 -부틸 및 헥실이다.

-C₂ -C₆ -알케닐은 탄소수 2, 3, 4, 5 또는 6인 직쇄 또는 측쇄 알케닐, 예를 들면, 알릴, 크로틸 및 펜타닐이다.

-C₂ -C₆ -알키닐은 탄소수 2, 3, 4, 5 또는 6인 직쇄 또는 측쇄 알키닐, 예를 들면, 프로피닐, 부틸닐 및 헥타닐이다.

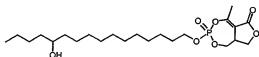
R¹ 은 바람직하게는, (1) -(CH₂)₁₅ CH₃, (2) -(CH₂)₁₃ CH(CH₃)₂, (3) -(CH₂)₁₁ CH(OH)(CH₂)₃CH₃, (4) -(CH₂)₁₁ CH(OH)CH₂CH(CH₃)₂, (5) -(CH₂)₁₂ CH(OH)(CH₂)₂CH₃, (6) -(CH₂)₁₃ CH(OH)CH₂CH₃, (7) -(CH₂)₁₄ CH(OH)CH₃, (8) -(CH₂)₁₅ CH₂(OH), (9) -(CH₂)₁₆ CH₃, (10.0) -(CH₂)₁₃ C=OCH₂CH₃, (11.0) -(CH₂)₁₂ C=OCH₂CH₂CH₃, (12.0) -(CH₂)₁₁ C=OCH₂CH₂CH₂CH₃, (13.0) -(CH₂)₁₃ CH₃, (14.0) -(CH₂)₁₁ CH(CH₃)₂, (15.0) -(CH₂)₁₄ CH₃ 또는 (16.0) -(CH₂)₁₂ CH(CH₃)₂이다.

R² 는 바람직하게는, C₁ -C₆ -알킬, 특히 메틸, 에틸 또는 프로필이다.

본 발명의 바람직한 화합물은 하기에 나타낸다:

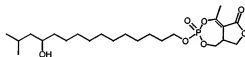
화학식 II의 사이클리포스틴 A

화학식 II



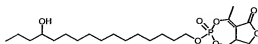
화학식 IIA의 사이클리포스틴 A2

화학식 IIA



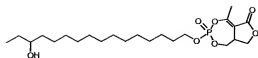
화학식 III의 사이클리포스틴 B

화학식 III



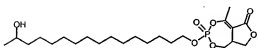
화학식 IV의 사이클리포스틴 C

화학식 IV



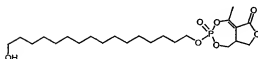
화학식 V의 사이클리포스틴 D

화학식 V



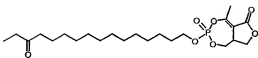
화학식 VI의 사이클리포스틴 E

화학식 VI



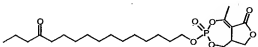
화학식 VII의 사이클리포스틴 F

화학식 VII



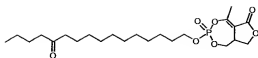
화학식 VIII의 사이클리포스틴 G

화학식 VIII



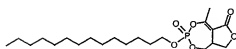
화학식 IX의 사이클리포스틴 H

화학식 IX



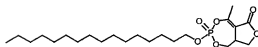
화학식 X의 사이클리포스틴 N

화학식 X



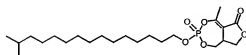
화학식 XI의 사이클리포스틴 P

화학식 XI



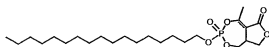
화학식 XIA의 사이클리포스틴 P2

화학식 XIA



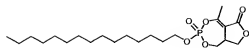
화학식 XII의 사이클리포스틴 Q

화학식 XII



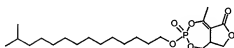
화학식 XIII의 사이클리포스틴 R

화학식 XIII



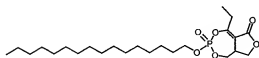
화학식 XIII의 사이클리포스틴 R2

화학식 XIII



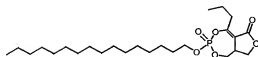
화학식 XIV의 사이클리포스틴 S

화학식 XIV



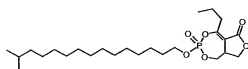
화학식 XV의 사이클리포스틴 T

화학식 XV



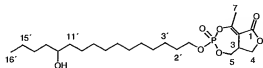
화학식 XVA의 사이클리포스틴 T2

화학식 XVA



의 모든 입체화학 형태 및 모든 비율의 이러한 형태의 혼합물 및 이의 생리학적으로 허용되는 염 및 화학적 등가물.

상기 언급된 화학식들에서 NMR 스펙트럼을 위한 탄소 원자의 번호 부여 방식은 다음과 같다:



그 자체로, 환제는 두 개의 비대칭으로 치환된 원자인, 탄소 원자 3 및 인 원자를 함유한다. 두 원자 모두는 R 또는 S 배위로 존재할 수 있다. 본원에 이르러, 놀랍게도, 균주 스트렙토마이세스 중 HAG 004107 (DSM 13381)은 각각의 경우 화학식 I의 화합물의 수 많은 입체이성체들을 형성할 수 있는 것으로 밝혀졌으며, 즉 상기 균주는 원자 C3 및 P가 서로 독립적으로 R 또는 S 배위를 취할 수 있는 화합물을 합성한다. R 배위에서 탄소(3) 및 S 배위에서 인 상에서 공간적 형태를 갖는 화학식 IA의 이성체들이 스트렙토마이세스 중 HAG 004107 (DSM 13381)의 배양물에서 증가된 양으로 생성된다.

화학식 IA



그러나, 또한, (R,R), (S,S) 또는 (S,R) 같은 다른 배위를 갖는 사이클리포스틴이 또한 형성되며, 이는 놀랍게도 또한 상당한 리파제-억제 작용을 갖는다.

화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염 또는 화학적 등가물은 화학식 I의 화합물 하나 이상이 배양 배지 중에 축적될 때까지 미생물 스트렙토마이세스 중 HAG 004107 (DSM 13381) 또는 이의 변이체 또는 돌연변이체를 적합한 상태하에서 배양 배지 중에서 발효시키고 이를 배양 배지로부터 분리하고 임의로 이들 화학적 등가물 및 생리학적으로 허용되는 염으로 전환시킴으로써 제조가능하다.

본 발명에 따른 사이클리포스틴은 악티노마이세탈레스 중, 바람직하게는 스트렙토마이세스 중 HAG 004107 (DSM 13381)에 의해 제조될 수 있다. 스트렙토마이세스 중 HAG 004107 (DSM 13381)은 아이보리색의 균사체 (RAL 1014)를 가지며 스트렙토마이세테스의 분생포자 특징으로 특성화된다.

분리물은 부타케스트 조약에 따라서 2000년 3월 16일자로 수탁번호 스트렙토마이세스 중 HAG 004107 (DSM 13381)로서 기탁기관[Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, mascheroder Weg 1B, D 38124 Braunschweig, Germany]에 기탁되었다.

균주 스트렙토마이세스 중 HAG 004107 (DSM 13381) 대신에, 또한 본 발명에 따른 하나 이상의 사이클리포스틴 화합물을 합성하는 이의 변이체 및 돌연변이체를 사용하는 것이 가능하다. 상기 돌연변이체는 물리적 방법, 예를 들면, 조사 예를 들면, 자외선 또는 X-선 조사에 의해서, 또는 화학적 돌연변이유발제, 예를 들면, 에틸 메탄설포네이트(EMS),

2 -하이드록시 -4 -메톡시 -벤조페논(MOB) 또는 N -메틸 -N' -니트로 -N -니트로소구아니딘(MNNG)에 의해서 그 자체로 공지된 방식으로 제조할 수 있다.

따라서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 하나 이상이 배양 배지 중에 축적될 때까지 미생물 스트렙토마이세스 중 HAG 0 04107(DSM 13381), 또는 이의 변이체 또는 돌연변이체를 적합한 상태에서 배양 배지 중에서 발효시키고 이를 배양 배지로부터 분리하고 임의로 이를 화학적 등가물 및 생리학적으 로 허용되는 염으로 전환시키는 것을 포함함을 특징으로 하는, 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으 로 허용되는 염을 제조하는 방법에 관한 것이다.

바람직하게는, 균주 스트렙토마이세스 중 HAG 004107(DSM 13381), 이의 돌연변이체 및/또는 변이체를 탄소 및 질소원 및 통상적인 무기염과 함께 영양 용액(또한 소위 배양 배지라고 불림)중에서 신규한 사이클리포스틴이 배양 배지중에 축적될 때까지 발효시키고, 이러한 사이클리포스틴을 배양 배지로부터 분리시키고 임의로 개별적인 활성 성분으로 분리시킨다.

발효는 바람직하게는 호기성 조건하에서 수행하며, 이는 18 내지 35℃ 정도의 온도 및 6 내지 8 정도의 pH에서 특히 잘 수행된다.

본 발명에 따른 방법은 연구실 규모(일리터 내지 리터 범위) 및 산업적 규모(입방 미터 범위)의 발효에 사용할 수 있다. 특별한 언급이 없는 한, 모든 백분율은 중량 단위이다. 특별한 언급이 없는 한, 액체의 경우 혼합비는 용적 단위이다.

호기성 발효를 위한 적합한 바람직한 탄소원은 동화가능한 탄수화물 및 당 알콜, 예를 들면, 글루코오스, 락토오스, 슈크로오스 또는 D -만니톨, 및 탄수화물 -함유 천연 생성물, 예를 들면, 귀리 파편, 대두 가루 및 맥아 추출물이다. 가능한 질소 -함유 영양분은 아이노산, 펩타이드 및 단백질, 및 이의 분해 생성물, 예를 들면, 펩톤 또는 트립톤, 추가로 육류 추출물, 효모 추출물, 분쇄된 종자, 예를 들면, 옥수수, 밀, 콩, 간장콩 또는 면화 식물의 분쇄물, 알콜 제조의 종류 잔사, 육류 가루 또는 효모 추출물 뿐만 아니라 암모늄염 및 질산염이 있다. 영양 용액이 함유할 수 있는 무기염은 예를 들면, 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속의 클로라이드, 카보네이트, 설페이트 또는 포스페이트, 철, 아연, 코발트 및 망간 이 있다.

본 발명에 따른 화학식 II 내지 XVA의 사이클리포스틴의 제조는 귀리 파편 및 미량 원소 약 0.1 내지 5%, 바람직하게는 0.3 내지 3%를 함유하는 배양 배지에서 특히 잘 수행된다. 백분율 단위의 기술은 각각의 경우 전체 배양 배지의 중량을 기준으로 한다.

화학식 VIII 내지 XVA의 사이클리포스틴의 바람직한 제조는 약 0.1 내지 5%, 바람직하게는 0.3 내지 2% 글리세롤, 0.2 내지 5%, 바람직하게는 0.5 내지 3% 간장콩 가루 및 0.05 내지 1.0g/l, 바람직하게는 0.1 내지 1.0g/l 염화나트륨을 함유하는 영양 배지 중에서 특히 용이하게 수행할 수 있다.

배양 배지에서, 스트렙토마이세스 중 HAG 004107(DSM 13381)은 사이클리포스틴 혼합물을 형성한다. 배양 배지의 조성에 따라서, 본 발명에 따른 하나 이상의 사이클리포스틴의 정량적 양은 변화할 수 있다. 또한, 개별적인 사이클리포스틴의 합성을 조절하기 위해서 배지 조성을 사용하여 하나 또는 하나 이상의 사이클리포스틴이 전혀 제조되지 않거나 미생물의 검출 한계 미만의 양으로 제조되게 하는 것이 가능하다.

배양물은 바람직하게는 검출가능한 사이클리포스틴을 함유한다. 사이클리포스틴 A, P 또는 P2가 바람직하게 형성된다.

사이클리포스틴 A 내지 T2(화학식 II 내지 XVA의 화합물) 이외에, 추가로 관련된 화합물이 스트렙토마이세스 중 HAG 004107(DSM 13381)의 배양 배지에서 형성되며, 이는 변형된 라디칼 R¹ 및 R²에 의해서 화학식 II 내지 XVA로 나타낸 화합물과 상이하다. 보다 소량으로, 말단 절단되거나 추가로 축체화된 라디칼 R¹을 갖는 사이클리포스틴이 검출되었다. 이러한 2차 성분들의 산화(하이드록실화) 생성물이 또한 스트렙토마이세스 중 HAG 004107(DSM 13381)의 배양물에서 검출가능하다.

미생물의 배양은 초기적으로 수행되며, 즉 예를 들면, 진탕 플라스크 또는 발효기에서 진탕 또는 교반과 함께, 경우에 따라 공기 또는 산소의 도입과 함께 실시된다. 이는 약 18 내지 35°C 범위, 바람직하게는 25 내지 32°C 범위, 특히 26 내지 30°C 범위의 온도에서 수행될 수 있다. pH 범위는 6 내지 8, 바람직하게는 6.5 내지 7.8의 범위이어야 한다. 상기 미생물은 상기 조건하에서, 일반적으로 24 내지 300시간, 바람직하게는 30 내지 90시간 동안 배양된다.

유리하게는, 배양은 다수의 단계로 수행되며, 즉 우선 하나 이상의 예비 배양물이 액체 배양 배지에서 제조된 후, 실질적인 제조 배지, 즉 주배양물로 예를 들면, 1:10의 용적비로 접종된다. 예비 배양물은 예를 들면, 균사체를 영양 용액에 접종시킨 후 이를 약 36 내지 120시간, 바람직하게는 48 내지 96시간 동안 성장시켜 수득한다. 균사체는 예를 들면, 균수를 약 3 내지 40일, 바람직하게는 4 내지 10일 동안 고체 또는 액체 영양 배지, 예를 들면, 맥아/효모/아가 또는 귀리 파편/아가 상에서 성장시켜 수득할 수 있다.

발효 과정은 배양물 또는 균사체 용액의 pH에 의해서, 및 박막 크로마토그래피 또는 고압 액체 크로마토그래피 같은 크로마토그래피 방법 또는 생물학적 활성 시험에 의해서 모니터링할 수 있다. 본 발명에 따른 사이클리포스틴은 균사체에 존재하며 보다 소량의 일부가 배양 여액에 또한 존재한다. 하기 기술되는 분리 과정은 본 발명에 따른 사이클리포스틴의 정제, 바람직하게는 사이클리포스틴 A 및 P의 정제를 위한 것이다.

배양 배지로부터 본 발명에 따른 사이클리포스틴의 분리 및/또는 정제는 상기 천연 물질의 화학적, 물리학적 및 생물학적 특성을 고려하여 공지된 방법으로 수행된다. 배양 배지에서 또는 개별적인 분리 단계에서 사이클리포스틴 농도를 시험하기 위해서, 예를 들면 메틸렌 클로라이드/에틸 아세테이트 또는 클로로포름/메탄올 혼합물(예를 들면, 정량비 98:1)을 용출액으로서 사용하여 실리카 겔 상에서의 박막 크로마토그래피 또는 HPLC를 사용할 수 있다. 박막 크로마토그래피 분리의 경우 검출은 예를 들면, 몰리브다트인산 또는 I_2 증기 같은 착색제를 사용하여 수행할 수 있으며, 형성된 물질의 양은 고정 용액을 사용하여 편리하게 비교한다.

본 발명에 따른 사이클리포스틴의 분리를 위해서, 균사체를 우선 통상적인 방법에 따라서 배양 배지로부터 분리시킨 후 사이클리포스틴은 물과 임의로 혼화성인 유기 용매를 사용하여 세포 덩어리로부터 추출한다. 유기 용매상은 본 발명에 따른 사이클리포스틴을 함유하며, 이는 임의로 진공에서 농축하고 추가로 하기 기술된 바와 같이 정제한다.

배양 여액은 임의로 균사체 추출물 농축물과 혼합하고 적합한 수-비혼화성 유기 용매, 예를 들면 n-부탄올 또는 에틸 아세테이트로 추출한다. 후속적으로 분리된 유기상은 임의로 진공에서 농축시키고 물/메탄올의 최초 용적의 1/30의 용적으로 용해시킨다.

본 발명에 따른 하나 이상의 사이클리포스틴의 추가적인 정제는 적합한 물질, 바람직하게는 예를 들면, 본자체 상에서, 정상상 지지체(예를 들면, 실리카 겔, 알루미나) 상에서, 이온 교환기 상에서, 흡착 수지 상에서 또는 역상(역상, RP)에서 크로마토그래피에 의해 수행한다. 사이클리포스틴은 이러한 크로마토그래피 방법의 도움으로 분리된다. 사이클리포스틴의 크로마토그래피는 유기 용매를 이용하거나 수용액 및 유기 용액의 혼합물을 이용하여 수행된다.

수용액 또는 유기 용액의 혼합물은 모든 수-혼화성 유기 용매, 바람직하게는 용매 10 내지 100%, 바람직하게는 용매 60 내지 90% 중 메탄올, 프로판올 및 아세토니트릴, 또는 대안으로 유기 용매와 혼화성인 모든 완충된 수용액을 의미하는 것으로 이해된다. 사용되는 완충액은 상기 지시된 바와 동일하다.

상이한 극성에 기초한 사이클리포스틴의 분리는, 예를 들면, MCI C_{18} (흡착 수지, 제조원: Mitsubishi, Japan) 또는 Amberlite XAD C_{18} (제조원: TOSHAAS) 상에서, 또는 추가의 소수성 물질, 예를 들면, RP-8 또는 RP-18 상에서 역상 크로마토그래피의 도움으로 수행된다. 또한, 분리는 예를 들면, 실리카 겔, 알루미나 등에서 정상상 크로마토그래피의 도움으로 수행될 수 있다.

사이클리포스틴의 크로마토그래피는 알콜 또는 다른 수-혼화성 유기 용매와 함께 완충되거나 산성화된 수용액 또는 수용액의 혼합물을 사용하여 수행된다. 사용되는 유기 용매는 바람직하게는 프로판올 및 아세토니트릴이다.

완충되거나 산성화된 수용액은 예를 들면, 1mM 내지 0.5M 농도의 물, 포스페이트 완충액, 암모늄 아세테이트, 시트레이트 완충액, 및 바람직하게는 0.01 내지 3%, 특히 0.1% 농도의 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산 또는 모든 당해 분야의 숙련자에게 공지된 이용가능한 산을 의미하는 것으로 이해된다.

크로마토그래피는 100% 수성 완충액으로 개시하여 100% 용매로 종결하는 구배를 사용하여 수행되며, 바람직하게는 50 내지 100% 2-프로판올 또는 아세토니트릴의 선형 구배로 수행된다.

대안으로, 겔 크로마토그래피 또는 소수성 상에서의 크로마토그래피가 또한 수행될 수 있다.

겔 크로마토그래피는 폴리아크릴아미드 겔 상에서 또는 Biogel-P 2 (제조원: Biorad), Fractogel TSK HW 40 (제조원: Merck, Germany 또는 Toso Haas, USA) 상에서, 또는 Sephadex (제조원: Pharmacia, Uppsala, Sweden) 같은 혼합 중합체 겔 상에서 수행된다.

상기 언급된 크로마토그래피의 순서는 가역적이다.

사이클로포스틴의 추가의 매우 효과적인 정제 단계는 결정화이다. 사이클로포스틴은 유기 용매중 용액으로부터 및 물과 유기 용매의 혼합물로부터 결정화된다. 결정화는 예를 들면, 포화된 사이클로포스틴 용액을 농축 또는 냉각시킴으로써 그 자체로 공지된 방법으로 수행된다.

본 발명에 따른 사이클로포스틴은 고체 또는 액체 상태 및 4 내지 8, 특히 5 내지 7의 pH 범위의 용액 중에서 안정하며, 따라서, 통상적인 약제학적 제제내로 도입시킬 수 있다.

본 발명은 추가로 약간의 화학적 차이를 갖는 즉, 동일한 활성을 갖거나 온전한 조건하에서 본 발명에 따른 화합물로 전환될 수 있는 화학식 I의 화합물의 명백한 화학적 등가물을 포함한다. 언급된 등가물은 예를 들면, 에스테르 및 에테르, 및 본 발명에 따른 화합물의 산화, 환원 및 수소화 생성물을 포함한다.

에스테르 및 에테르 유도체, 산화 수소화 및 환원 생성물은 예를 들면, 문헌[Advanced Organic Synthesis, 4th Edition, J. March, John Wiley & Sons., 1992]에 기술된 방법에 따라서 제조할 수 있다.

본 발명은 화학식 I 내지 XVA의 화합물의 모든 입체이성체 형태를 포함한다. 화학식 I 내지 XVA의 화합물내에 함유된 비대칭성 중심은 모두 서로 독립적으로 S 배위 또는 R 배위를 가질 수 있다. 본 발명은 모든 가능한 에난티오머 및 부분입체이성체 뿐만 아니라 모든 비율의 두 개 이상의 입체이성체 형태의 혼합물, 예를 들면, 에난티오머 및/또는 부분입체이성체의 혼합물을 포함한다. 따라서, 본 발명은 라선 및 우선 대장체, R 및 S 배위 모두의 에난티오머적으로 순수한 형태, 라세미체 형태 및 모든 비율의 두 개의 에난티오머의 혼합물 형태의 에난티오머에 관한 것이다. 시스템스 이성화의 존재하에서, 본 발명은시스 형태 및 트랜스 형태 모두 및 모든 비율의 이러한 형태의 혼합물에 관한 것이다.

유용한 약제학적 특성으로 인해, 본 발명에 따른 화합물은 사람 및/또는 수의학적 의약에서 약제로서 사용하기에 적합하다. 이는 리파제를 억제하고 지질 대사의 혼란으로 야기되는 대사성 질환의 치료에 바람직한 특성을 갖는다. 본 발명에 따른 화학식 I의 화합물은, 인슐린에 의해 억제되고 지방 세포에서 지방의 분해에 관여하여 지방 구성분들의 혈류로의 수송에 관여하는 지방세포내 알로스테릭 효소인 호르몬-감수성 리파제 HSL에 대한 놀라운 억제 작용을 갖는다. 따라서, 상기 효소의 억제는 본 발명에 따른 화합물의 인슐린-유사 활성에 상응하며, 이는 결국 혈중 유리 지방산 및 혈당의 감소를 초래한다. 따라서, 이는 비인슐린-의존성 전성 당뇨병, 당뇨병 증후군 및 췌장에 대한 직접적인 손상 같은 대사 장애에서 사용할 수 있다.

따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 사이클로포스틴 및/또는 이의 화학적 동가물 하나 이상을 함유하는 약제학적 제제에 관한 것이다. 적합한 부형제 또는 담체 물질과의 혼합물의 사용이 바람직하다. 사람에서 사용될 수 있는 담체 물질은 모든 약제학적으로 허용되는 담체 물질 및/또는 부형제이다.

본 발명은 추가로 본 발명에 따른 약제의 제조 방법에 관한 것이며, 이는 본 발명에 따른 화합물 하나 이상을 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체 및 경우에 따라 추가의 적합한 활성 화합물, 부가제 또는 부형제를 사용하여 적합한 투여형제로 도입하는 것을 포함함을 특징으로 한다.

본 발명에 따른 약제는 일반적으로, 경구, 국소적 또는 비경구적으로 투여하지만, 직장내 투여가 또한 원칙적으로 가능하다. 적합한 고체 또는 액체 약제학적 제제 형태는 예를 들면, 입제, 산제, 정제, 제피정제, (미세)캡슐제, 좌제, 시럽제, 유제, 현탁제, 에어로졸, 격자제 또는 엠폴형 중 주사가능한 용제, 및 활성 화합물의 방출이 지연된 제제이며, 이러한 제제에서, 봉쇄제, 제피제, 팽창제, 활주제 또는 윤활제, 중미제, 감미제 또는 용해제 같은 비활성 및 부가제 및/또는 부형제가 통상적으로 사용된다. 언급될 수 있는 흔히 사용되는 비활성 또는 부형제는 예를 들면, 탄산마그네슘, 이산화티탄, 락토오스, 만니톨 및 기타 당류, 활석, 유즙 단백질, 젤라틴, 전분, 비타민, 셀룰로오스 및 이의 유도체, 동물성 또는 식물성 오일, 폴리에틸렌 글리콜 및 윤배(예를 들면, 멸균수, 알콜, 클리세올 및 다가 알콜)가 있다.

경우에 따라, 투여 단위는 입자 형태의 활성 화합물을 적합한 중합체, 왁스 등으로 제피하거나 이에 합침시켜, 방출을 지연시키거나 보다 오랜 시간 동안 방출시키기 위해서 경구 투여용으로 미세캡슐화시킬 수 있다.

바람직하게는, 약제학적 제제는 각각의 단위가 본 발명에 따른 사이클로포스틴 화합물 및/또는 이의 화학적 유도체 하나 이상의 특정 투여량을 활성 성분으로서 함유하는 투여 단위로 제조되고 투여된다. 정제, 캡슐제 및 좌제 같은 고체 투여 단위의 경우, 이러한 투여량은 약 200mg 이하, 바람직하게는 약 0.1 내지 100mg/일일 수 있으며, 엠폴 중 주사용제의 경우, 약 200mg, 바람직하게는 0.1 내지 100mg/일이다.

투여되는 1일 투여량은 포유동물의 체중, 연령, 성별 및 상태에 따른다. 그러나, 특정 상황에서, 보다 많거나 적은 1일 투여량이 또한 적합할 수 있다. 1일 투여량의 투여는 개별 투여 단위의 형태 또는 수 많은 보다 더 작은 투여 단위의 형태로 단일 투여에 의해서, 또는 특정 간격으로 세분된 투여량의 반복적인 투여에 의해서 수행될 수 있다.

본 발명은 또한, 본 발명에 따른 사이클로포스틴 및/또는 이의 화학적 유도체 하나 이상을 함유하는 약제학적 제제에 관한 것이다. 적합한 부형제 또는 담체 물질과의 혼합물의 사용이 바람직하다. 사람의 경우, 사용되는 담체 물질은 모든 약제학적으로 허용되는 담체 물질 및/또는 부형제일 수 있다.

본 발명에 따른 화학식 I의 화합물의 작용은 하기 효소 시험 시스템 상에서 시험되었다.

효소 제조:

부분 정제된 HSL의 제조:

블리넨 매트 지방 세포는 공개된 방법[예를 들면, S. Nilsson et al., Anal. Biochem. 158, 1986, 399-407; G. Fredriksson et al., J. Biol. Chem. 256, 1981, 6311-6320; H. Tornquist et al., J. Biol. Chem. 251, 1976, 813-819]에 따라 비처리 수컷 매트(위스타, 220 내지 250g)의 부고환 지방 조직으로부터 콜라게나제 처리하여 수득한다. 10마리 매트로부터의 지방 세포를 각각의 경우 균질화 완충액(25mM 트리스/HCl, pH 7.4, 0.25M 슈크로오스, 1mM EDTA, 1mM DTT, 10μg/ml 튜벤신, 10μg/ml 안티케인, 20μg/ml 펩스타틴) 50ml로 부양시켜 3회 세척하고 최종적으로 균질화 완충액 10ml에 넣는다. 상기 지방 세포를 테플론-인-글라스 균질화기(제조원: Braun-Melsungen)에서 1500rpm 및 15°C에서 10회 좌에 의해 균질화시킨다. 균질화물을 원심분리(Sorvall SM24 튜브, 5000rpm, 10분, 4°C)시킨다. 증폭되는 지방층과 펠렛 사이의 하부층을 제거하고 원심분리를 반복한다. 이로부터 수득되는 하부층을 다시 한번 원심분리(Sorvall SM24 튜브, 20000rpm, 45분, 4°C)한다. 하부층을 제거하고 해파린-세파로오스(제조원:

Pharmacia -Biotech, CL -6B, 25mM 트리스/HCl, pH 7.4, 150mM NaCl로 5회 세척) 1g으로 처리한다. 4℃에서 60분 동안 항은 처리(15분 간격으로 교환시킴)한 후, 상기 배치를 원심분리(Sorvall SM24 튜브, 3000rpm, 10분, 4℃)한다. 상등액을 아세트산을 추가하여 pH 5.2로 만들고 4℃에서 30분 동안 항온처리한다. 침전물을 원심분리(Sorvall SS34, 12000rpm, 10분, 4℃)시켜 수집하고 20mM 트리스/HCl, pH 7.0, 1mM EDTA, 65mM NaCl, 13% 슈크로오스, 1mM DTT, 10μg/ml 류페틴/렘스타틴/안티헤인의 2.5ml 중에 현탁시킨다. 상기 현탁액을 25mM 트리스/HCl, pH 7.4, 50% 글리세롤, 1mM DTT, 10μg/ml 류페틴, 렘스타틴, 안티헤인에 대해서 4℃에서 밤새 투석한 후 수성항 원형(현탁액 1ml 당 0.1g, 10mM 인산칼륨으로 평형시킴, pH 7.0, 30% 글리세롤, 1mM DTT)에 적용시킨다. 상기 원형을 20 내지 30ml/h의 유속으로 4배 용적으로 평형 완충액으로 세척한다. HSL은 0.5M 인산칼륨을 함유하는 다량의 평형 완충액과 함께 용출되며, 이를 투석(상기 참조)한 후 4℃에서 한외여과(제조원: Amicon Diaflo PM 10 Filter)하여 5 내지 10배 농축시킨다. 부분 정제된 HSL을 4 내지 6주 동안 -70℃에서 저장할 수 있다.

검정법:

기질을 제조하기 위해서, 25 내지 50 μCi [³H]트리올레오일글리세롤(폴루엔증), 6.8 μMol 비표지된 트리올레오일글리세롤 및 0.6mg 인지질(포스파티딜콜린/포스파티딜이노시톨 3:1 w/v)을 혼합하고, N₂로 건조시킨 후 초음파 처리(B. Braun 250, 미세팁, 세팅 1 -2, 1분 간격으로 1분 2회)하여 0.1M KP_i (pH 7.0) 2ml내로 넣는다. 1ml KP_i 부가 및 다시 초음파 처리(30초 간격으로 빙상에서 30초 4회)한 후, 20% BSA(소 혈청 알부민) (KP_i 중) 1ml를 부가한다(트리올레오일글리세롤의 최종 농도 1.7mM). 반응을 위해서, 100μl 기질 용액을 100μl HSL 용액(상기 제조된 HSL, 20mM KP_i, pH 7.0, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.02% BSA, 20μg/ml 렘스타틴, 10μg/ml 류페틴 중 희석됨)에 피펫팅하고 37℃에서 30분 동안 항온처리한다. 3.25ml 메탄올/클로로포름/헵탄(10:9:7) 및 1.05ml 0.1M K₂CO₃, 0.1M 붕산(pH 10.5)를 부가한 후, 상기 배치를 잘 혼합하고 최종적으로 원심분리(800 × g, 20분)한다. 상 분리 후, 상부 상(1ml) 1당량을 제거하고 역제 신틸레이션 측정법으로 방사능을 측정한다.

평가:

물질은 통상적으로 4개의 독립적인 배치에서 시험한다. 시험 물질에 의한 HSL의 효소적 활성의 억제제는 비억제된 대조군 반응물과의 비교에 의해 측정한다. IC₅₀ 값의 측정은 시험 물질 10배 이상의 농축물을 사용한 억제 곡선에 의해 수행된다. 데이터의 분석을 위해서, GRAPHIT 소프트웨어 패키지(제조원: Elsevier -BIOSOFT)를 사용한다.

상기 시험에서, 화합물은 하기 작용을 나타낸다:

사이클리포스틴 A, P, P2 및 R은 IC₅₀ = 약 0.2 μM로 헷트 지방 세포에서 지방분해를 억제하며 이들은 기질로서 트리올레오일글리세롤을 사용하는 사람 호르몬 -감수성 리파제(HSL)을 억제시킨다; IC₅₀ = 약 0.07 내지 0.5 μM. 기질로서 NBD(4 -클로로-7 -니트로벤조 -2 -옥사 -1,3 -디아졸)를 사용하는 경우, 헷트로부터의 HSL은 4nM 내지 10nM의 농도로 억제된다.

사이클리포스틴은 마이크로몰 이하의 농도에서 헷트 추출물의 호르몬 -감수성 리파제(HSL) 및 모노아실글리세롤 리파제 모두를 억제한다.

본 발명은 하기 실시예로서 추가로 예시된다. 퍼센트는 중량 단위이다. 특별한 언급이 없는 한, 액체의 경우에 혼합비는 용적 단위이다.

실시예

실시예 1

스트렙토마이세스 종 HAG 004107(DSM 13381)의 글리세롤 배양물의 제조

멸균시킨 300ml 에를렌마이어 플라스크 중 영양 용액(백아 추출물 2.0%, 효모 추출물 0.2%, 글루코오스 1.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.05%, pH 6.0) 100ml에 균주 스트렙토마이세스 중 HAG 004107(DSM 13381)을 접종하고 7일 동안 28℃ 및 180rpm에서 진탕 교반기 상에서 배양한다. 이후, 이러한 배양물 1.5ml를 99% 농도의 클리세롤 1.5ml로 희석하고 -20℃에서 저장한다.

실시예 2

스트렙토마이세스 중 HAG 004107(DSM 13381)의 에를렌마이어 플라스크 중 예비배양물의 제조

하기 영양 용액(15g/ℓ 글루코오스, 15g/ℓ 대두 가루, 5g/ℓ 옥수수 침지액, 2g/ℓ CaCO_3 및 5g/ℓ NaCl) 100ml를 함유하는 멸균시킨 300ml 에를렌마이어 플라스크에 사면 튜브(동일한 영양 용액이지만, 2% 아가를 함유) 상에서 배양시킨 배양물 또는 1ml 클리세롤 배양물(실시예 1 참조)을 접종하고 교반기 상에서 180rpm 및 28℃에서 배양한다. 동일한 영양 용액의 48 내지 96시간된 침지 배양물(접종량 약 10%)이 10 및 200 ℓ 발효기의 접종용으로 충분하다.

실시예 3

스트렙토마이세스 중 HAG 004107(DSM 13381)의 배양물의 에를렌마이어 플라스크 중 제조

하기 영양 용액(20g/ℓ 개 사육용 귀리 단편 및 2.5ml 미량 원소 용액) 100ml를 함유하는 멸균시킨 300ml 에를렌마이어 플라스크에 10% 접종량의 예비 배양물(실시예 2)을 접종하고 교반기 상에서 180rpm 및 28℃에서 배양한다. 상기 배양물을 사이클리포스틴의 수득을 위해서 또는 발효기에 접종시키기 위해서 2일 후에 사용할 수 있다. 미량 원소 용액은 하기 조성(3g/ℓ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1g/ℓ Fe(III) 시트레이트, 0.2g/ℓ $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.1g/ℓ ZnCl_2 , 0.025g/ℓ $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.02g/ℓ Na 테트라보레이트, 0.004g/ℓ $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01g/ℓ Na 몰리브데이트)을 갖는다.

실시예 4

화합식 II 내지 IX의 사이클리포스틴의 제조

하기 조건의 영양 용액(영양 배지: 20g/ℓ 수중 귀리 단편, 2.5ml/ℓ 미량 원소, pH 7.8(멸균 전)) 90 ℓ를 함유하는 200 ℓ 발효기를 사용한다. 상기 영양 용액을 30분 동안 가열 멸균시키고 냉각시킨 후, 5% 용액을 실시예 3에 따라 수득된 접종 물질로 접종한다.

미량 원소:

3g/ℓ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$;

1g/ℓ Fe(III) 시트레이트;

0.2g/ℓ $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

0.1g/ℓ ZnCl_2 ;

0.025g/ℓ $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$;

0.02g/ℓ Na 테트라보레이트

0.004g/ℓ $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$;

0.01g/ℓ Na 몰리브데이트.

공정 시간: 72시간

배양 온도: 28℃

교반 속도: 90rpm

통기성: 공기 6m³/시간.

발효는 소포제 부가 없이 수행된다. 최대 생산성은 약 40 내지 76시간 후에 달성된다.

실시예 5

사이클리포스틴 X 내지 XVA의 제조

100 ℓ 영양 배지(5g/ℓ 글루코오스, 20g/ℓ 글리세롤, 20g/ℓ 대두 가루, 5g/ℓ 효모 추출물, 3g/ℓ NaCl, 2.5mℓ/ℓ 미량 원소 용액, pH 7.0(멸균전))로 충전시킨 하기 조건하에서 200 ℓ 발효기를 사용한다.

공정 시간: 72시간

배양 온도: 27℃

교반 속도: 65rpm

통기성: 공기 6m³/시간.

발효는 발포 형성을 억제하는 제제의 부가 없이 수행된다. 최대 생산성은 약 48시간 후에 달성된다.

실시예 6

스트렙토마이세스 종 HAG 004107 (DSM 13381)의 배양 용액으로부터 사이클로포스틴 혼합물의 분리

스트렙토마이세스 종 HAG 004107 (DSM 13381)의 발효를 완료한 후, 실시예 4에 따라 수득된 발효기로부터의 배양 브로쓰 100 ℓ를 약 2% 충전 보조제(예를 들면, Cellite (℥))를 부가하여 충전시키고 세포 덩어리(10 ℓ)를 메탄올 40 ℓ로 추출한다. 활성 화합물-함유 메탄올계 용액을 여과시켜 균사체로부터 유리시키고 진공하에 농축시킨다. 농축액을 준비된 7 ℓ(℥ MCI GEL, CHP20P 컬럼에 적용시킨다. 물 내지 프로판 -2 -올의 구배를 사용하여 용출을 수행한다. 컬럼유 (20 ℓ/시간)를 분획(각각 10 ℓ)으로 수집하고 사이클리포스틴을 함유하는 분획 (19 내지 21)을 각각의 경우 진공하에서 농축시킨다. 분획을 HPLC(실시예 7 참조)로 조사한다. 분획 19는 사이클리포스틴 A 내지 E 및 이의 이성체를 포함하고, 분획 20은 사이클리포스틴 F 및 이의 이성체를 포함하며, 분획 21은 억제제 사이클리포스틴 N, P, P2, Q, R, S 및 T 및 이의 이성체를 포함한다.

실시예 7

사이클리포스틴의 HPLC 분석

사이클리포스틴의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석은 YMC Pack Pro C18 (℥) 컬럼 [AS -303, 250 x 4.6mm, S -5 μm, 120 Å)을 사용하여 HP 1100 (℥) 유니트에서 수행된다. 유속은 1mℓ/분이며 컬럼 온도는 40℃이다. 0.05% 트리플루오로아세트산 내지 아세트니트릴의 구배를 사용한다. 100% 아세트니트릴은 11분 후 용출액으로서 달성되며 이후, 컬럼은 이러한 용매로 추가로 일정하게 (등용매로) 용출된다. 검출은 210nm에서 자외선 흡수를 측정함으로써 수행된다. 이러한 방법을 사용하여, 사이클리포스틴은 하기 분류 시간을 갖는다:

사이클리포스틴 A 12.7분,
 사이클리포스틴 A2 12.6분,
 사이클리포스틴 F 13.2분,
 사이클리포스틴 N 15.9분,
 사이클리포스틴 P 17.7분,
 사이클리포스틴 P2 17.3분,
 사이클리포스틴 Q 18.3분,
 사이클리포스틴 R 16.7분,
 사이클리포스틴 R2 16.4분,
 사이클리포스틴 S 18.5분,
 사이클리포스틴 T 19.1분 및
 사이클리포스틴 T2 18.7분.

실시예 8

순수한 사이클리포스틴 A 및 A2의 제조

실시예 6에 따라 수득된 분획 19를 진공에서 농축시키고 물/메탄올(1:1)에 용해시킨 상기 농축물을 Nucleoprep 100-5 C₁₈ AB[®] 컬럼 (21 x 250mm)에 적용시킨다. 0.01% 트리플루오로아세트산 중 50% 아세토니트릴 내지 100% 아세토니트릴의 구배를 사용하여 용출을 수행한다. 유속은 50ml/분이다. 컬럼 유속을 210nm에서 흡광도를 측정하고 리파제-억제 특성을 시험하여 검사한다. 각각 60ml의 분획을 수득한다. 사이클리포스틴 A는 분획 34 및 35에서 확인되며, 사이클리포스틴 A2는 분획 41 내지 44에서 확인된다. 이러한 분획들은 각각의 경우 혼합하여 진공하에 농축시키고 S P 250/10 Nucleosil 100-5 C₁₈ HD[®] 컬럼 상에서 연속적으로 분리시킨다. 선택된 구배는 0.01% 트리플루오로아세트산 중 50 내지 66% 아세토니트릴이며 용액의 pH는 수산화암모늄 용액을 첨가하여 4.0으로 조정하였다. 순수한 화합물을 함유하는 분획들을 각각의 경우 혼합하고 동결 건조시켰다. 이로써 약 5.4mg의 순수한 사이클리포스틴 A 5.4mg 및 오일로서 사이클리포스틴 A2 3mg가 수득된다.

실시예 9

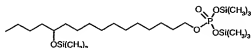
사이클리포스틴 A의 특성화

외관: 증색, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 약성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm

IR 밴드: 1752 및 1671 cm⁻¹.

니트로벤질 알콜/LiCl 매트릭스를 사용한 고-해상도 FAB 질량 분광분석법에 의해, 분자량 467.2757 amu가 확인되며, C₂₃H₄₁O₇PLi의 사이클리포스틴 A -Li에 대한 실험식에 상응한다. 이로부터, C₂₃H₄₁O₇P의 사이클리포스틴 A에 대한 실험식이 수득되며, 분자량은 460이다. 전자 분무 질량 분광분석법에 의해 양이온화 모드(ESI, 포지티브)에서 (M+H)⁺에 상응하는 461amu에서 피크가 확인되며, 추가로 C₇H₁₀O₆P에 상응하는 221amu에서 특징적인 피크가 확인된다. ESI 네가티브 모드에서, 459amu (M-H)⁻, 337amu (C₁₆H₃₄O₅P) 및 219amu (C₇H₈O₆P)가 확인된다. 알콜 그룹의 위치를 측정하기 위해서, N-메틸-N-트리메틸실릴트리플루오로아세트아미드를 사용한 유도체화를 수행하고 샘플을 전자 이온화 질량 분광분석법으로 조사한다. 트리메틸실릴 유도체는 질량 554amu의 하기 구조식을 갖는다.



실릴화된 하이드록실 그룹의 위치는 497amu (α -절단) 및 159amu (α -절단)에서 집중적인 이온에 의해 나타난다. NMR 시그널: 표 1 참조.

[표 1] 300K에서 메탄올-d

	¹ H	¹³ C
1	-	171.08 (1.4Hz) ^{b)}
2	-	114.61 (3.4Hz) ^{b)}
3	3.87	40.75
4	4.46/3.86	66.04
5	4.31/4.25	69.39 (6.0Hz) ^{b)}
6	-	161.47 (8.0Hz) ^{b)}
7	2.40	17.89 (4.6Hz) ^{b)}
1'	4.25	71.61 (6.6Hz) ^{b)}
2'	1.73	31.16 (6.6Hz) ^{b)}
3'	1.41	26.39
n'	3.49	72.45
n±1	1.46 -1.33	38.44, 38.15
4' -14' (a)	1.37 -1.26	30.85 -30.58
15'	1.34	23.84
16'	0.91	14.43

a) n 및 n±1 제외. b) ¹³C/¹H P 커플링 상수는 괄호안에 나타낸다.

실시예 10

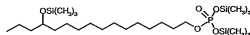
사이클리포스틴 B의 특성화

사이클리포스틴 B는 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해 사이클리포스틴 A에 대해 실시예 8에서 기술된 바와 같이 분리하고 실시예 9에서와 같이 특성화한다.

외관: 증설, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 왁스성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

전자 분무 질량 분광분석법에 의해, 양이온화 모드(ESI, 포지티브)에서 (M+H)⁺에 상응하는 461amu에서의 피크가 확인되며, 추가로 C₇H₁₀O₆P에 상응하는 221amu에서의 특징적인 피크가 확인된다. ESI 네가티브 모드에서, 459amu (M-H)⁻, 337amu(C₁₆H₃₄O₅P) 및 219amu(C₇H₈O₆P)가 확인된다. 알콜 그룹의 위치를 측정하기 위해서, 유도체화를 N-메틸-N-트리메틸실릴트리플루오로아세트아미드를 사용하여 수행하고 샘플을 전자 이온화 질량 분광분석법으로 조사한다. 트리메틸실릴 유도체는 질량 554amu의 하기 화학식을 갖는다.



실릴화된 하이드록실 그룹의 위치는 511amu(α -절단) 및 145amu(α -절단)에서 집중적인 이온에 의해 나타난다.

사이클리포스틴 B의 실험식: C₂₃H₄₁O₇P, 분자량: 460.

실시예 11

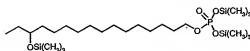
사이클리포스틴 C의 특성화

사이클리포스틴 C는 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해 사이클리포스틴 A에 대해 실시예 8에서 기술된 바와 같이 분리하고 실시예 9에서와 같이 특성화한다.

외관: 중성, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 왁스성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm

전자 분무 질량 분광분석법에 의해, 양이온화 모드(ESI, 포지티브)에서 (M+H)⁺에 상응하는 461amu에서의 피크가 확인되며, 또한 C₇H₁₀O₆P에 상응하는 221amu에서의 특이적인 피크가 확인된다. ESI 네가티브 모드에서, 459amu (M-H)⁻, 337amu(C₁₆H₃₄O₅P) 및 219amu(C₇H₈O₆P)가 확인된다. 알콜 그룹의 위치를 측정하기 위해서, 유도체화를 N-메틸-N-트리메틸실릴트리플루오로아세트아미드를 사용하여 수행하고 샘플을 전자 이온화 질량 분광분석법으로 조사한다. 트리메틸실릴 유도체는 질량 554amu의 하기 화학식을 갖는다.



실릴화된 하이드록실 그룹의 위치는 525amu(α -절단) 및 131amu(α -절단)에서 집중적인 이온으로 나타난다.

사이클리포스틴 C의 실험식: C₂₃H₄₁O₇P, 분자량: 460.

실시예 12

사이클리포스틴 F의 특성화

실시예 6에 따른 분획 20을 실시예 8에 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 F를 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해 분리하고 실시예 9에서와 같이 특성화한다.

잔류 시간: 13.2분.

외관: 중성, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 왁스성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

전자 분무 질량 분광분석법에 의해서, 양이온화 모드(ESI, 포지티브)에서 (M+H)⁺에 상응하는 459amu에서의 피크가 확인되며, 추가로 C₇H₁₀O₆P에 상응하는 221amu에서의 특징적인 피크가 확인된다. ESI 네가티브 모드에서, 457.6amu (M-H)⁻, 336amu (C₁₆H₃₂O₅P) 및 219amu (C₇H₈O₆P)가 확인된다. 사이클리포스틴 F의 실험식: C₂₃H₃₉O₇P, 분자량: 458.

실시예 13

사이클리포스틴 P의 특성화

실시에 5 및 6에 따라 수득된 분획 21을 실시예 8에 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 P를 크로마토그래 단계의 다중 반복에 의해 분리 (210mg)하고 실시예 9에서와 같이 특성화한다.

사이클리포스틴 P는 프로판 -2-올 3mL 및 아세트니트릴 13mL 중 상기 210mg을 용해시키고 물 8mL를 부가하여 결정화시킨다. 여과하고 찬 아세트니트릴로 세척한 후, 사이클리포스틴 135mg의 최종 중량을 수득하며, 용점은 58 내지 59°C이다.

잔류 시간: 17.7분.

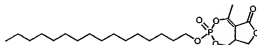
외관: 중성, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 왁스성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

IR 밴드: 2917, 2852, 1753, 1671, 1471, 1214, 996 및 832cm⁻¹.

니트로벤질알릴 매트릭스를 사용하는 고분해능 FAB 질량 분광분석법에 의해서, 하기 분자량 445.2717amu이 확인되며 C₂₃H₄₂O₆P의 사이클리포스틴 P에 대한 (M+H)⁺에 상응한다. 이로부터, C₂₃H₄₁O₆P의 사이클리포스틴 P의 실험식이 수득되며, 분자량은 444이다.

전자 분무 질량 분광분석법에 의해서, 양이온화 모드(ESI, 포지티브)에서 (M+H)⁺에 상응하는 445amu에서의 피크가 확인되며, 추가로 C₇H₁₀O₆P에 상응하는 221amu에서의 특징적인 피크가 확인된다. ESI 네가티브 모드에서, 443 (M-H)⁻, 321amu (C₁₆H₃₄O₄P) 및 219amu (C₇H₈O₆P)가 확인된다.



NMR 데이터는 표 2에서 나타났다.

[표 2]

	^1H	^{13}C
1	-	171.08
2	-	114.60 (3.0Hz) ^{a)}
3	3.87	40.74
4	4.47/3.85	66.05
5	4.30/4.25	69.40 (6.0Hz) ^{a)}
6	-	161.47 (8.0Hz) ^{a)}
7	2.40	17.90 (4.6Hz) ^{a)}
1'	4.24	71.62 (6.9Hz) ^{a)}
2'	1.73	31.16 (6.3Hz) ^{a)}
3'	1.41	26.38
4' -13'	1.34 -1.29	30.76 -30.11
14'	1.34 -1.29	33.07
15'	1.31	23.72
16'	0.89	14.42

a) ^{13}C ^1H 커플링 상수는 괄호안에 나타낸다.

실시예 14

사이클리포스틴 P2의 특성화

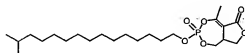
실시예 5 및 6에 따라 수득된 분획 21을 실시예 8에 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 P2는 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해 분리 (130mg)하고 실시예 9에서와 같이 특성화한다.

관류 시간: 17.1분.

외관: 중성, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 오일성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

니트로벤질알콜 매트릭스를 사용하는 고분해능 FAB 질량 분광분석법에 의해서, 하기 분자량 445.2721amu이 확인되며, $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_6$ P의 사이클리포스틴 P에 대한 $(\text{M}+\text{H})^+$ 에 상응한다. 이로부터, $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{O}_6$ P의 사이클리포스틴 P2에 대한 실험식은 분자량 444를 초래한다. 전자 분무 질량 분광분석법에 의해, 양이온화 모드 (ESI, 포지티브)에서 $(\text{M}+\text{H})^+$ 에 상응하는 445amu에서 피크가 확인되며, 추가로 $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_6$ P에 상응하는 221amu에서의 특징적인 피크가 확인된다. ESI 네가티브 모드에서, 443amu ($\text{M}-\text{H})^-$, 321amu ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_4$ P) 및 219amu ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_6$ P)가 확인된다.



사이클리포스틴 P2의 NMR 데이터는 표 3에 나타낸다.

[표 3]

	^1H	^{13}C
1	-	171.05
2	-	114.60 (3.2Hz) ^{a)}
3	3.87	40.74
4	4.46/3.85	66.02
5	4.30/4.25	69.38 (6.0Hz) ^{a)}
6	-	161.46 (8.0Hz) ^{a)}
7	2.40	17.90 (4.6Hz) ^{a)}
1'	4.24	71.60 (6.9Hz) ^{a)}
2'	1.73	31.16 (6.3Hz) ^{a)}
3'	1.41	26.39
4' -11'	1.34 -1.29	31.04 -30.11
12'	1.29	28.53
13'	1.17	40.25
14'	1.52	29.15
15', 16'	0.87	23.04
a) $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ 커플링 상수는 괄호안에 나타낸다.		

실시에 15

사이클리포스틴 N의 수득 및 특성화

실시에 5 및 6에 따라 수득된 분획 21은 실시에 8에 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 N은 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해서 분리(2mg)하고 실시에 9에서와 같이 특성화한다.

잔류 시간: 15.9분.

외관: 층상, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 오일성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

FAB 조건하에 고분해능 질량 분광분석법에 의해, 417.2405에서 유사-분자 이온(M+H)⁺이 C₂₁H₃₈O₆P의 실험식(이론치: 417.2406)에 상응하는 것으로 관찰되었다. ESI⁺ 모드에서 특징적인 단편: 221amu.

[표 4]

	¹ H	¹³ C
1	-	171.07
2	-	114.60 (3.1Hz) ^{a)}
3	3.87	40.74
4	4.45/3.84	66.03
5	4.30/4.25	69.39 (5.9Hz) ^{a)}
6	-	161.47 (8.0Hz) ^{a)}
7	2.40	17.90 (4.9Hz) ^{a)}
1'	4.24	71.60 (6.6Hz) ^{a)}
2'	1.73	31.16 (6.2Hz) ^{a)}
3'	1.41	26.38
4' -11'	1.35 -1.26	30.76 -30.11
12'	1.35 -1.26	33.06
13'	1.31	23.72
14'	0.89	14.41

a) ¹³C β¹ P 커플링 상수는 괄호안에 나타났다.

실시예 16

사이클리포스틴 R의 수득 및 특성화

실시예 5 및 6에 따라 수득된 분획 21은 실시예 8에서 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 R은 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해서 분리 (8mg)하고 실시예 9에서와 같이 특성화한다.

잔류 시간: 16.7분

외관: 층상, 무색, 산소-함유 유기 용매에 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 결정성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

FAB 조건하에서 고분해능 질량 분광분석법에 의해, 431.2561에서 준-분자 이온 (M+H)은 C₂₂H₄₀O₆P의 실험식 (이론치: 431.2562)에 상응하는 것으로 관찰되었다. ESI⁺ 모드에서 특징적인 단편: 221amu.

[표 5]

	¹ H	¹³ C
1	-	171.06
2	-	114.58 (3.2Hz) ^{a)}
3	3.87	40.75
4	4.45/3.85	66.04
5	4.30/4.25	69.40 (6.0Hz) ^{a)}
6	-	161.48 (8.0Hz) ^{a)}
7	2.40	17.90 (5.0Hz) ^{a)}
1'	4.24	71.61 (7.0Hz) ^{a)}
2'	1.73	31.16 (6.2Hz) ^{a)}
3'	1.41	26.38
4' -12'	1.37 -1.25	30.74 -30.10
13'	1.17	33.06
14'	1.30	23.71
15'	0.89	14.40

a) ¹³C^{β1} P 커플링 상수는 괄호안에 나타낸다.

실시에 17

사이클리포스틴 R2의 수득 및 특성화

실시에 5 및 6에 따라 수득된 분획 21을 실시에 8에 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 R2는 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해 분리 (8mg)하고 실시에 9에서와 같이 특성화한다.

잔류 시간: 16.4분.

외관: 중성, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 오일성 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

FAB 조건하에서 고분해능 질량 분석분석법에 의해, 431.2564에서 준-분자 이온(M+H)은 C₂₂H₄₀O₆P의 실험식(이론치: 431.2562)에 상응하는 것으로 관찰되었다. ESI + 모드에서 특징적인 단편: 221amu.

[표 6]

	¹ H	¹³ C
1	-	171.06 (1.7Hz) ^{a)}
2	-	114.58 (3.1Hz) ^{a)}
3	3.87	40.75
4	4.46/3.85	66.03
5	4.30/4.25	69.39 (6.0Hz) ^{a)}
6	-	161.47 (8.0Hz) ^{a)}
7	2.40	17.90 (4.9Hz) ^{a)}
1'	4.24	71.60 (6.9Hz) ^{a)}
2'	1.73	31.16 (6.6Hz) ^{a)}
3'	1.41	26.38
4' -10'	1.37/1.25	31.02 -30.10
11'	1.29	28.51
12'	1.16	40.24
13'	1.51	29.15
14', 15'	0.87	23.02

a) ¹³C/³¹P 커플링 상수는 괄호안에 나타난다.

실시예 18

사이클리포스틴 S의 수득 및 특성화

실시예 5 및 6에 따라 수득된 분획 21을 실시예 8에 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 S는 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해 분리 (0.7mg) 하고 실시예 9에서와 같이 특성화한다.

잔류 시간: 18.5분.

외관: 증성, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 고체 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

FAB 조건하에서 고분해능 질량 분광분석법에 의해, 459.2883에서 준-분자 이온(M+H)이 C₂₄H₄₄O₆P의 실험식(이론치: 459.2575)에 상응하는 것으로 관찰되었다. ESI + 모드에서 특징적인 단편: 235amu.

[표 7]

	¹ H	¹³ C
1	-	170.87(1.4Hz) ^{a)}
2	-	113.66(3.1Hz) ^{a)}
3	3.85	40.77
4	4.45/3.85	66.04
5	4.29/4.24	69.17(6.0Hz) ^{a)}
6	-	165.80(8.3Hz) ^{a)}
7	2.98/2.82	25.05(4.6Hz) ^{a)}
8	1.16	10.86
1'	4.25	71.57(6.9Hz) ^{a)}
2'	1.74	31.19(6.3Hz) ^{a)}
3'	1.42	26.41
4' -13'	1.34 -1.29	30.76 -30.11
14'	1.34 -1.29	33.07
15'	1.31	23.73
16'	0.89	14.43
a) ¹³ C/ ³¹ P 커플링 상수는 괄호안에 나타낸다.		

실시에 19

사이클리포스틴 T의 수득 및 특성화

실시에 5 및 6에 따라 수득된 분획 21을 실시에 8에 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 T는 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해 분리(5mg)하고 실시에 9에서와 같이 특성화한다.

잔류 시간: 19.1분.

외관: 층상, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 고체 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

FAB 조건하에서 고분해능 질량 분광분석법에 의해, 473.3030에서의 준-분자 이온(M+H)이 C₂₅H₄₆O₆P의 실험식(이론치: 473.3032)에 상응하는 것으로 관찰되었다. ESI + 모드에서의 특징적인 단편: 249amu.

[표 8]

	¹ H	¹³ C
1	-	170.98 (1.7Hz) ^{a)}
2	-	114.39 (3.1Hz) ^{a)}
3	3.87	40.78
4	4.46/3.85	66.02
5	4.29/4.26	69.23 (5.9Hz) ^{a)}
6	-	164.69 (8.7Hz) ^{a)}
7	2.89/2.83	33.35 (4.5Hz) ^{a)}
8	1.65	20.63
9	0.98	13.84
1'	4.25	71.57 (6.6Hz) ^{a)}
2'	1.74	31.18 (6.2Hz) ^{a)}
3'	1.42	26.42
4' -13'	1.34 -1.29	30.78 -30.11
14'	1.34 -1.29	33.06
15'	1.31	23.72
16'	0.89	14.42
a) ¹³ C/ ³¹ P 커플링 상수는 괄호안에 나타낸다.		

실시예 20

사이클리포스틴 T2의 수득 및 특성화

실시예 5 및 6에 따라 수득된 분획 21을 실시예 8에서 기술된 바와 같이 분리하고 사이클리포스틴 T2는 크로마토그래피 단계의 다중 반복에 의해 분리 (4mg) 하고 실시예 9에서와 같이 특성화한다.

잔류 시간: 18.7분.

외관: 중성, 무색, 산소-함유 유기 용매에서 가용성이지만 물 및 석유 에테르에서는 난용성인 고체 물질.

UV 최대치: 메탄올 중 228nm.

FAB 조건하에서 고분해능 질량 분광분석법에 의해, 473.3035에서 준-분자 이온 (M+H)⁺이 C₂₅H₄₆O₆P의 실험식 (이론치: 473.3032)에 상응하는 것으로 관찰되었다. ESI⁺ 모드에서 특징적인 단편: 249amu.

[표 9]

	¹ H	¹³ C
1	-	170.98 (1.7Hz) ^{a)}
2	-	114.40 (3.1Hz) ^{a)}
3	3.87	40.78
4	4.46/3.85	66.02
5	4.29/4.25	69.23 (5.9Hz) ^{a)}
6	-	164.69 (8.7Hz) ^{a)}
7	2.90/2.83	33.35 (4.5Hz) ^{a)}
8	1.65	20.63
9	0.98	13.84
1'	4.24	71.57 (6.9Hz) ^{a)}
2'	1.74	31.18 (6.2Hz) ^{a)}
3'	1.42	26.42
4' -11'	1.37 -1.25	31.03 -30.11
12'	1.29	28.52
13'	1.17	40.25
14'	1.52	29.15
15', 16'	0.87	23.03

a) ¹³C/¹H P 커플링 상수는 괄호안에 나타낸다.

실시예 21

호르몬 -감수성 리파제 (HSL)의 억제

랫토로부터의 호르몬 -감수성 리파제는 기질로서 트리올레오일글리세롤을 사용하여 하기 농도 (IC₅₀)에서 억제된다:

사이클리포스틴 A: 20nM,

사이클리포스틴 N: 450nM,

사이클리포스틴 P: 30nM,

사이클리포스틴 P2: 40nM,

사이클리포스틴 R: 10nM,

사이클리포스틴 R2: 220nM,

사이클리포스틴 S: 20nM,

사이클리포스틴 T: 200nM,

사이클리포스틴 T2: 60nM.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

모든 입체화학 형태 및 모든 비율의 이러한 형태의 혼합물로서 화학식 I의 화합물, 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염 및 화학적 등가물.

화학식 I



상기식에서,

R¹은 (1) 직쇄 또는 측쇄, 포화 또는 불포화된, 카보 - 또는 헤테로사이클릭일 수 있고, 치환되지 않거나 (1.1) -OH, (1.2) =O, (1.3) -O -C₁ -C₆ -알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.4) -O -C₂ -C₆ -알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.5) -C₁ -C₆ -알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.6) -아릴, (1.7) -C₁ -C₆ -알킬벤젠, (1.8) -디페닐, (1.9) -NH -C₁ -C₆ -알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.10) -NH -C₂ -C₆ -알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.11) -NH₂, (1.12) =S, (1.13) -S -C₁ -C₆ -알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 측쇄이다), (1.14) -S -C₂ -C₆ -알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 측쇄이다) 또는 (1.15) 할로젠(이때, 치환체 (1.1) 내지 (1.15)는 또한 부가적으로 치환될 수 있다)에 의해 일 - 또는 이치환된, 탄소수 2 내지 30의 탄소쇄; 또는 (2) [-아릴 - (CH₂)_n]_m이 치환되지 않거나 치환체 (1.1) 내지 (1.15)로 일 - 또는 이치환된 - [-아릴 - (CH₂)_n]_m(이때, n 및 m은 서로 독립적으로 0, 1, 2 또는 3의 정수이다)이고;

R²는 (1) C₁ -C₆ -알킬(이때, 알킬은 치환되지 않거나 치환체 (1.1) 내지 (1.15)로 일 - 또는 이치환된다), (2) C₂ -C₆ -알케닐(이때, 알케닐은 치환되지 않거나 치환체 (1.1) 내지 (1.15)로 일 - 또는 이치환된다), 또는 (3) C₂ -C₆ -알키닐(이때, 알키닐은 치환되지 않거나 (1.1) 내지 (1.15)로 일 - 또는 이치환된다)이고;

E는 인(P) 또는 황(S) 원자이며,

X₁, X₂ 및 X₃는 서로 독립적으로 (1) -O -, (2) -NH -, (3) -N=, (4) -S - 또는 (5) -CH₂ - 및 -CHR² -이다.

청구항 2.

제1항에 있어서, R¹이 직쇄 또는 측쇄, 포화 또는 불포화, 카보 - 또는 헤테로사이클릭일 수 있는, 치환되지 않거나 치환체 (1.1) 내지 (1.15)로 일 - 또는 이 - 치환된 탄소수 10 내지 18의 탄소쇄임을 특징으로 하는, 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, R¹이 (1) -(CH₂)₁₅ CH₃, (2) -(CH₂)₁₃ CH(CH₃)₂, (3) -(CH₂)₁₁ CH(OH)(CH₂)₃ CH₃, (4) -(CH₂)₁₁ CH(OH)CH₂CH(CH₃)₂, (5) -(CH₂)₁₂ CH(OH)(CH₂)₂ CH₃, (6) -(CH₂)₁₃ CH(OH)CH₂CH₃, (7) -(CH₂)₁₄ CH(OH)CH₃, (8) -(CH₂)₁₅ CH₂(OH), (9) -(CH₂)₁₆ CH₃, (10) -(CH₂)₁₃ C=OCH₂CH₃, (11) -(CH₂)₁₂ C=OCH₂CH₂CH₃, (12) -(CH₂)₁₁ C=OCH₂CH₂CH₂CH₃, (13) -(CH₂)₁₃ CH₃, (14) -(CH₂)₁₁ CH(CH₃)₂, (15) -(CH₂)₁₄ CH₃ 또는 (16) -(CH₂)₁₂ CH(CH₃)₂임을 특징으로 하는, 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염.

청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R²가 C₁ -C₆ -알킬임을 특징으로 하는, 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염.

청구항 5.

제4항에 있어서, R^2 가 $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ 또는 $-CH_2CH_2CH_3$ 임을 특징으로 하는, 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으 허용되는 염.

청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물 스트렙토마이세스 종 HAG 004107 (DSM 13381) 또는 이의 변이체 또는 돌연변이체 중 하나를 화학식 I의 화합물 하나 이상이 배양 배지 중에 축적될 때까지 적합한 조건하에서 배양 배지중에 발효시키고, 이를 배양 배지로부터 분리시키며 임의로 이를 화학적 등가물 또는 생리학적으로 허용되는 염으로 전환시킴으로써 제조가능한, 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염.

청구항 7.

미생물 스트렙토마이세스 종 HAG 004107 (DSM 13381) 또는 이의 변이체 또는 돌연변이체 중 하나를 화학식 I의 화합물 하나 이상이 배양 배지 중에 축적될 때까지 적합한 조건하에서 배양 배지중에 발효시키고, 이를 배양 배지로부터 분리시키며 임의로 이를 화학적 등가물 또는 생리학적으로 허용되는 염으로 전환시키는 것을 포함함을 특징으로 하는, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염의 제조 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 발효를 18 내지 35°C의 온도 및 6 내지 8의 pH에서 호기성 조건하에 수행함을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염.

청구항 10.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 리파제 억제용 약제로서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염.

청구항 11.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항당뇨병제로서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염.

청구항 12.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염 하나 이상을 함유하는 약제학적 제제.

청구항 13.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염 하나 이상을 적합한 부형제 및/또는 비히클을 사용하여 적합한 투여형으로 도입시키는 것을 포함함을 특징으로 하는, 제12항에 따른 약제학적 제제의 제조 방법.

청구항 14.

스트렙토마이세스 종 HAG 004107 (DSM 13381).